

REC

03 Rec'd PCT/PTO

17 APR 1991

INTERNATIONAL APPLICATION  
UNDER THE  
PATENT COOPERATION TREATY  
REQUEST

THE UNDERSIGNED REQUESTS THAT THE PRESENT  
INTERNATIONAL APPLICATION BE PROCESSED  
ACCORDING TO THE PATENT COOPERATION TREATY

(The following is to be filled in by the receiving Office)

INTERNATIONAL APPLICATION No. **PCT/NL 90/00130**

INTERNATIONAL FILING DATE: **11 SEP 1990 (11 09 90)**

OCTROOIRAAD

(Stamp) **PCT INTERNATIONAL APPLICATION**  
Name of receiving Office and PCT International Bureau

Applicant's or Agent's File Reference  
(indicated by applicant if desired) **PCT 0172**

**Box No. I TITLE OF INVENTION**

Human parvovirus B19 proteins and virus-like particles, their  
production, and their use in diagnostic assays and vaccines.

**Box No. II APPLICANT (WHETHER OR NOT ALSO INVENTOR); DESIGNATED STATES FOR WHICH HE/SHE/IT IS APPLICANT.** Use this box for indicating the applicant or, if there are several applicants, one of them. If more than one person (includes, where applicable, a legal entity) is involved, continue in Box No. III.

The person identified in this box is (check one only): ☐ applicant and inventor\* ☒ applicant only

Name and address:\*\*

Rijksuniversiteit te Leiden  
Stationsweg 46  
2312 AV Leiden  
the Netherlands

Telephone number  
(including area code)

Telegraphic address:

Teleprinter address:

Country of nationality

NL

Country of residence:\*\*\*

NL

The person identified in this box is *applicant* for the purposes of (check one only):

☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

**Box No. III FURTHER APPLICANTS, IF ANY; (FURTHER) INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE).** A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes, where applicable, a legal entity). If the following two sub-boxes are insufficient, continue in the "Supplemental Box," (giving there for each additional person the same indications as those requested in the following two sub-boxes) or by using a "continuation sheet."

The person identified in this sub-box is (check one only): ☒ applicant and inventor\* ☐ applicant only ☐ inventor only\*

Name and address:\*\*

Brown, Caroline Sarah  
Frans van Mierisstraat 85 huis  
1071 RM Amsterdam  
the Netherlands

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

Country of nationality:

GB

Country of residence:\*\*\*

NL

and whether that person is *applicant* for the purposes of (check one only):

☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (check one only): ☐ applicant and inventor\* ☐ applicant only ☐ inventor only\*

Name and address:\*\*

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

Country of nationality:

Country of residence:\*\*\*

and whether that person is *applicant* for the purposes of (check one only):

☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

\* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States, give the necessary indications in the "Supplemental box."

\*\* Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the country (name).

\*\*\* If residence is not indicated, it will be assumed that the country of residence is the same as the country indicated in the address.

**Box No. IV AGENT (IF ANY) OR COMMON REPRESENTATIVE (IF ANY): ADDRESS FOR NOTIFICATIONS (IN CERTAIN CASES).** A common representative may be appointed only if there are several applicants and if no agent is or has been appointed; the common representative must be one of the applicants.  
The following person (includes, where applicable, a legal entity) is hereby/has been appointed as agent or common representative to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities:

Name and address, including postal code and country:

If the space below is used instead for an address for notifications, mark here ☐

Smulders, Th.A.H.J.  
VEREENIGDE OCTROOIBUREAUX  
Nieuwe Parklaan 107  
2587 BP The Hague  
the Netherlands

Telex 32270 union nl

Telephone number:  
(including area code) 070-3500464

Telegraphic  
address:

Teleprinter  
address: 070-3522723

**Box No. V DESIGNATION OF GROUPS OF STATES OR STATES (1); CHOICE OF CERTAIN KINDS OF PROTECTION OR TREATMENT.** The following designations are hereby made (please mark the applicable check-boxes):

#### Regional Patent

☒ **EP European Patent**(2): AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany (Federal Republic of), DK Denmark, ES Spain, FR France, GB United Kingdom, IT Italy, LU Luxembourg, NL Netherlands, SE Sweden,  
and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☐ **OA OAPI Patent:** Benin, Burkina Faso, Cameroon, Central African Republic, Chad, Congo, Gabon, Mali, Mauritania, Senegal, Togo,  
and any other State which is a Contracting State of OAPI and of the PCT; if other OAPI title desired, specify on dotted line(3):  
.....

**National Patent** (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line(3))

|  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> AT Austria(3) .....                               | <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea(3) .....                   |
| <input type="checkbox"/> AU Australia(3) .....                             | <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....                              |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados .....                                 | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg(3) .....                          |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria(3) .....                              | <input type="checkbox"/> MC Monaco(3) .....                              |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil(3) .....                                | <input type="checkbox"/> MG Madagascar .....                             |
| <input type="checkbox"/> CA Canada .....                                   | <input type="checkbox"/> MW Malawi(3) .....                              |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein .....     | <input type="checkbox"/> NL Netherlands .....                            |
| <input type="checkbox"/> DE Germany (Federal Republic of)(3) .....         | <input type="checkbox"/> NO Norway .....                                 |
| .....  | <input type="checkbox"/> RO Romania .....                                |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark .....                                  | <input type="checkbox"/> SD Sudan .....                                  |
| <input type="checkbox"/> ES Spain(3) .....                                 | <input type="checkbox"/> SE Sweden .....                                 |
| <input type="checkbox"/> FI Finland .....                                  | <input type="checkbox"/> SU Soviet Union(3) .....                        |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom .....                           | .....  |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary .....                                  | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America(3) ..... |
| <input type="checkbox"/> JP Japan(3) .....                                 | .....  |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea(3) ..... | .....  |
| .....  | .....  |

Space reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after the issuance of this sheet:  
.....

- (1) The applicant's choice of the order of designations may be indicated by marking the check-boxes with sequential arabic numerals (see also the "Notes to Box No. V").
- (2) The selection of particular States for a European patent can be made upon entering the national (regional) phase before the European Patent Office (see also the "Notes to Box No. V").
- (3) If another kind of protection or a title of addition or, in the United States of America, treatment as a continuation or a continuation-in-part is desired, specify according to the instructions given in the "Notes to Box No. V."

**Box No. VI PRIORITY CLAIM (IF ANY).** The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

| Country (country in which it was filed if national application; one of the countries for which it was filed if regional or international application) | Filing Date (day, month, year)    | Application No. | Office of Filing (fill in only if the earlier application is an international application or a regional application) |
|---|-----------------------------------|-----------------|--|
| (1) NL  | 14 september 1989<br>(14. 09. 89) | 8902301         |  |
| (2)   |                                   |                 |  |
| (3)   |                                   |                 |  |

(Letter codes may be used to indicate country and/or Office of filing)

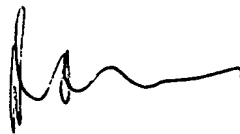
When the earlier application was filed with the Office which, for the purposes of the present international application, is the receiving Office, the applicant may, *against payment of the required fee*, ask the following:
☐ the receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the above-mentioned earlier application/of the earlier applications identified above by the numbers (insert the applicable numbers)
**Box No. VII EARLIER SEARCH (IF ANY).** Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been requested (or completed) and the said Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of the said earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request.

International application number or number and country (or regional Office) of other application:

8902301

International/regional/national filing date (14. 09. 89)  
14 september 1989Date of request for search: (24. 01. 90)  
24 january 1990

Number (if available) given to search request: SN 14954 NL

**Box No. VIII SIGNATURE OF APPLICANT(S) OR AGENT**


H. A. Duere

If the present Request form is signed on behalf of any applicant by an agent, a separate power of attorney appointing the agent and signed by the applicant is required. If in such case it is desired to make use of a general power of attorney (deposited with the receiving Office), a copy thereof must be attached to this form.

**Box No. IX CHECK LIST (To be filled in by the Applicant)**

This international application contains the following number of sheets:

- |                |           |               |
|----------------|-----------|---------------|
| 1. request     | 3         | sheets        |
| 2. description | 18        | sheets        |
| 3. claims      | 8         | sheets        |
| 4. abstract    | 1         | sheets        |
| 5. drawings    | 1         | sheets        |
| <b>Total</b>   | <b>31</b> | <b>sheets</b> |

Figure number 1 of the drawings (if any) is suggested to accompany the abstract for publication.

This international application as filed is accompanied by the items checked below:

1. ☐ separate signed power of attorney
2. ☐ copy of general power of attorney
3. ☐ priority document(s) (see Box No. VI)
4. ☐ receipt of the fees paid or revenue stamps
5. ☐ cheque for the payment of fees
6. ☒ request to charge deposit account
7. ☒ other document (specify)

"Fee Calculation Sheet"

(The following is to be filled in by the receiving Office)

1. Date of actual receipt of the purported international application: 11 SEP 1990 (11. 09. 90)

2. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:

3. Date of timely receipt of the required corrections under Article 11 of the PCT:

4. Drawings ☒ Received ☐ No Drawings

(The following is to be filled in by the International Bureau)

Date of receipt of the record copy:

03 OCTOBER 1990 (03. 10. 90)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/NL 90/00130

|   |   |                                     |
|---|---|-------------------------------------|
| <b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>   |   |                                     |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC   |   |                                     |
| IPC <sup>5</sup> : C 12 N 15/35, C 12 N 5/10, C 12 P 21/02, C 12 N 15/86,<br>G 01 N 33/569, A 61 K 39/23, A 61 K 39/295   |   |                                     |
| <b>II. FIELDS SEARCHED</b>  |   |                                     |
| Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>   |   |                                     |
| Classification System   | Classification Symbols  |                                     |
| IPC <sup>5</sup>  | C 07 K, C 12 N, A 61 K  |                                     |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation<br>to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>   |   |                                     |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>  |   |                                     |
| Category <sup>9</sup>   | Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>  | Relevant to Claim No. <sup>13</sup> |
| Y   | Bio/Technology, volume 6, no. 1, January 1988<br>V.A. Luckow et al.: "Trend in the development of baculovirus expression vectors", pages 47-55<br>see table 1<br>---  | 1-48                                |
| Y   | Bio/Technology, volume 5, no. 10, October 1987, (New York, US),<br>W.P. Sisk et al.: "Expression of human parvovirus B19 structural protein in E. coli and detection of antiviral antibodies in human serum", pages 1077-1088<br>see the whole article<br>cited in the application<br>--- | 1-48                                |
| P,A   | EP, A, 0341611 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.)<br>15 November 1989<br>see the whole document<br>-----   | 1-48                                |
| <p><sup>9</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |   |                                     |
| <b>IV. CERTIFICATION</b>  |   |                                     |
| Date of the Actual Completion of the International Search   | Date of Mailing of this International Search Report   |                                     |
| 14th December 1990  | 24 JAN 1991   |                                     |
| International Searching Authority   | Signature of Authorized Officer   |                                     |
| EUROPEAN PATENT OFFICE  | MISS T. TAZELAAR  |                                     |

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

NL 9000130  
SA 40044

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 16/01/91  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP-A- 0341611                             | 15-11-89            | None                       |                     |

PATENT COOPERATION TREATY

14 Rec'd PGT/PTO

24 OCT 1990

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/NL90/00130

NOTIFICATION TO THE DESIGNATED  
OFFICE OF RECEIPT OF  
RECORD COPY  
issued under PCT Rule 24.2(a)

To:

United States Patent  
and Trademark Office  
Washington, D.C.

in its capacity as a designated Office

DATE OF MAILING OF  
THIS NOTIFICATION:  
03 October 1990 (03.10.90)

From:  
The International Bureau of WIPO  
1211 Geneva 20  
Switzerland

NAME(S) OF APPLICANT(S):

BROWN, Caroline, Sarah

INTERNATIONAL FILING DATE:

11 September 1990 (11.09.90)

PRIORITY DATE(S) CLAIMED:

14 September 1989 (14.09.89)

DATE OF RECEIPT OF RECORD COPY BY INTERNATIONAL BUREAU:  
03 October 1990 (03.10.90)

J.-L. Baron  
(Authorized Officer)

REC

COPY

17 Rec'd PCT/RO

18 APR 1991

INTERNATIONAL APPLICATION  
UNDER THE  
PATENT COOPERATION TREATY  
REQUEST

THE UNDERSIGNED REQUESTS THAT THE PRESENT  
INTERNATIONAL APPLICATION BE PROCESSED  
ACCORDING TO THE PATENT COOPERATION TREATY

(The following is to be filled in by the receiving Office)

INTERNATIONAL  
APPLICATION No. PCT/NL 90 / 00 130

INTERNATIONAL  
FILING DATE: 11 SEP 1990 (11.09.90)

OCTROOIRAAD

(Stamp) PCT INTERNATIONAL APPLICATION  
Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or Agent's File Reference  
(indicated by applicant if desired)

PCT 0172

Box No. I TITLE OF INVENTION

Human parvovirus B19 proteins and virus-like particles, their  
production, and their use in diagnostic assays and vaccines.

Box No. II APPLICANT (WHETHER OR NOT ALSO INVENTOR); DESIGNATED STATES FOR WHICH HE/SHE/IT IS  
APPLICANT. Use this box for indicating the applicant or, if there are several applicants, one of them. If more than one person (includes, where  
applicable, a legal entity) is involved, continue in Box No. III.

The person identified in this box is (check one only): ☐ applicant and inventor\* ☒ applicant only

Name and address:\*\*

Rijksuniversiteit te Leiden  
Stationsweg 46  
2312 AV Leiden  
the Netherlands

Telephone number  
(including area code)

Telegraphic address:

Teleprinter address:

Country of nationality:

NL

Country of residence:\*\*\*

NL

The person identified in this box is *applicant* for the purposes of (check one only):

☐ all designated States

☒ all designated States except  
the United States of America

☐ the United States  
of America only

☐ the States indicated  
in the "Supplemental Box"

Box No. III FURTHER APPLICANTS, IF ANY; (FURTHER) INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR  
WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE). A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes, where  
applicable, a legal entity). If the following two sub-boxes are insufficient, continue in the "Supplemental Box," (giving there for each addi-  
tional person the same indications as those requested in the following two sub-boxes) or by using a "continuation sheet."

The person identified in this sub-box is (check one only): ☒ applicant and inventor\* ☐ applicant only ☐ inventor only\*

Name and address:\*\*

Brown, Caroline Sarah  
Frans van Mierisstraat 85 huis  
1071 RM Amsterdam  
the Netherlands

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

Country of nationality:

GB

Country of residence:\*\*\*

NL

and whether that person is *applicant* for the purposes of (check one only):

☐ all designated States

☐ all designated States except  
the United States of America

☒ the United States  
of America only

☐ the States indicated  
in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (check one only): ☐ applicant and inventor\* ☐ applicant only ☐ inventor only\*

Name and address:\*\*

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

Country of nationality:

Country of residence:\*\*\*

and whether that person is *applicant* for the purposes of (check one only):

☐ all designated States

☐ all designated States except  
the United States of America

☐ the United States  
of America only

☐ the States indicated  
in the "Supplemental Box"

\* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States,  
give the necessary indications in the "Supplemental box."

\*\* Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal entity by  
its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the country (name).

\*\*\* If residence is not indicated, it will be assumed that the country of residence is the same as the country indicated in the address.

**Box No. IV AGENT (IF ANY) OR COMMON REPRESENTATIVE (IF ANY): ADDRESS FOR NOTIFICATIONS (IN CERTAIN CASES).** A common representative may be appointed only if there are several applicants and if no agent is or has been appointed: the common representative must be one of the applicants.  
The following person (includes, where applicable, a legal entity) is hereby/has been appointed as agent or common representative to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities:

Name and address, including postal code and country:

If the space below is used instead for an address for notifications, mark here ☐

Smulders, Th.A.H.J.  
VEREENIGDE OCTROOIBUREAUX  
Nieuwe Parklaan 107  
2587 BP The Hague  
the Netherlands

Telex 32270 union nl

Telephone number: (including area code) 070-3500464  
Telegraphic address:

Teleprinter address: 070-3522723

**Box No. V DESIGNATION OF GROUPS OF STATES OR STATES (1); CHOICE OF CERTAIN KINDS OF PROTECTION OR TREATMENT.** The following designations are hereby made (please mark the applicable check-boxes):

**Regional Patent**

☒ **EP European Patent**(2): AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany (Federal Republic of), DK Denmark, ES Spain, FR France, GB United Kingdom, IT Italy, LU Luxembourg, NL Netherlands, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☐ **OA OAPI Patent:** Benin, Burkina Faso, Cameroon, Central African Republic, Chad, Congo, Gabon, Mali, Mauritania, Senegal, Togo, and any other State which is a Contracting State of OAPI and of the PCT; if other OAPI title desired, specify on dotted line(3):

**National Patent** (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line(3))

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> AT Austria(3)                               | <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea(3)                   |
| <input type="checkbox"/> AU Australia(3)                             | <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                              |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados                                 | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg(3)                          |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria(3)                              | <input type="checkbox"/> MC Monaco(3)                              |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil(3)                                | <input type="checkbox"/> MG Madagascar                             |
| <input type="checkbox"/> CA Canada                                   | <input type="checkbox"/> MW Malawi(3)                              |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein     | <input type="checkbox"/> NL Netherlands                            |
| <input type="checkbox"/> DE Germany (Federal Republic of)(3)         | <input type="checkbox"/> NO Norway                                 |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark                                  | <input type="checkbox"/> RO Romania                                |
| <input type="checkbox"/> ES Spain(3)                                 | <input type="checkbox"/> SD Sudan                                  |
| <input type="checkbox"/> FI Finland                                  | <input type="checkbox"/> SE Sweden                                 |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom                           | <input type="checkbox"/> SU Soviet Union(3)                        |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary                                  | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America(3) |
| <input type="checkbox"/> JP Japan(3)                                 |  |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea(3) |  |

Space reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after the issuance of this sheet:

- (1) The applicant's choice of the order of designations may be indicated by marking the check-boxes with sequential arabic numerals (see also the "Notes to Box No. V").  
(2) The selection of particular States for a European patent can be made upon entering the national (regional) phase before the European Patent Office (see also the "Notes to Box No. V").  
(3) If another kind of protection or a title of addition or, in the United States of America, treatment as a continuation or a continuation-in-part is desired, specify according to the instructions given in the "Notes to Box No. V."



**Box No. VI PRIORITY CLAIM (IF ANY).** The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

| Country (country in which it was filed if national application; one of the countries for which it was filed if regional or international application) | Filing Date (day, month, year)    | Application No. | Office of Filing (fill in only if the earlier application is an international application or a regional application) |
|---|-----------------------------------|-----------------|--|
| (1) NL  | 14 september 1989<br>(14. 09. 89) | 8902301         |  |
| (2)   |                                   |                 |  |
| (3)   |                                   |                 |  |

(Letter codes may be used to indicate country and/or Office of filing)

When the earlier application was filed with the Office which, for the purposes of the present international application, is the receiving Office, the applicant may, *against payment of the required fee*, ask the following:
☐ the receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the above-mentioned earlier application/of the earlier applications identified above by the numbers (insert the applicable numbers)
**Box No. VII EARLIER SEARCH (IF ANY).** Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been requested (or completed) and the said Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of the said earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request.

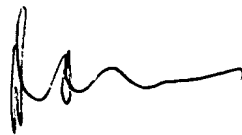
International application number or number and country (or regional Office) of other application:

8902301

International/regional/national filing date

(14. 09. 89)  
14 september 1989Date of request for search: (24. 01. 90)  
24 january 1990

Number (if available) given to search request: SN 14954 NL

**Box No. VIII SIGNATURE OF APPLICANT(S) OR AGENT**


H. A. Duve

If the present Request form is signed on behalf of any applicant by an agent, a separate power of attorney appointing the agent and signed by the applicant is required. If in such case it is desired to make use of a general power of attorney (deposited with the receiving Office), a copy thereof must be attached to this form.

**Box No. IX CHECK LIST** (To be filled in by the Applicant)

This international application contains the following number of sheets:

|                |           |               |
|----------------|-----------|---------------|
| 1. request     | 3         | sheets        |
| 2. description | 18        | sheets        |
| 3. claims      | 8         | sheets        |
| 4. abstract    | 1         | sheets        |
| 5. drawings    | 1         | sheets        |
| <b>Total</b>   | <b>31</b> | <b>sheets</b> |

Figure number 1 of the drawings (if any) is suggested to accompany the abstract for publication.

This international application as filed is accompanied by the items checked below:

- ☐ separate signed power of attorney
- ☐ copy of general power of attorney
- ☐ priority document(s) (see Box No. VI)
- ☐ receipt of the fees paid or revenue stamps
- ☐ cheque for the payment of fees
- ☒ request to charge deposit account
- ☒ other document (specify)

"Fee Calculation Sheet"

(The following is to be filled in by the receiving Office)

1. Date of actual receipt of the purported international application: 11 SEP 1990 (11. 09. 90)

2. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:

3. Date of timely receipt of the required corrections under Article 11 of the PCT:

4. Drawings ☒ Received ☐ No Drawings

(The following is to be filled in by the International Bureau)

Date of receipt of the record copy:

03 OCTOBER 1990

(03. 10. 90)

## BESCHRIJVING

Humaan parvovirus B19 eiwitten en virus-achtige partikels, hun produktie en hun gebruik in diagnostische assays en vaccins

De uitvinding ligt zowel op het gebied van de genetische manipulatie door middel van de recombinant DNA technologie ten behoeve van de produktie van bepaalde eiwitten en/of deeltjes, die uit een of meer van deze eiwitten zijn opgebouwd, als op de gebieden van de diagnostiek en de vaccinerbereiding. De uitvinding betreft bepaalde virale eiwitten, al dan niet in de vorm van virus-achtige deeltjes, welke eiwitten of deeltjes bijvoorbeeld gebruikt kunnen worden in assays voor het detecteren van tegen deze eiwitten gerichte antilichamen, of gebruikt kunnen worden om dergelijke antilichamen in handen te krijgen, of gebruikt kunnen worden om protectie tegen het virus te realiseren, of gebruikt kunnen worden voor het daarin inbouwen van epitopen van eiwitten van andere pathogenen om protectie tegen deze andere pathogenen te realiseren (derhalve verschillende mogelijkheden van gebruik voor vaccinatiedoeleinden).

Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op de manteleiwitten VP1 en VP2 van het humane parvovirus B19 en op virus-achtige partikels, die uit VP2 of uit VP1 en VP2 bestaan. De uitvinding betreft tevens genetische informatie in de vorm van recombinante expressievectoren, die de voor deze eiwitten coderende genen bevatten, en organismen die dankzij genetische manipulatie onder toepassing van dergelijke vectoren het vermogen hebben verworven om de desbetreffende eiwitten en/of deeltjes te produceren.

Het humane parvovirus B19 werd in 1975 bij toeval ontdekt in serummonsters van enkele gezonde bloeddonoren. Sindsdien is gebleken dat het virus de veroorzaker is van erythema infectiosum - ook wel bekend als "vijfde ziekte" - en van de

zogenaamde "aplastische crisis" bij patienten met chronische hemolytische anemie. Het B19-virus wordt voorts geassocieerd met abortus en vruchtdood, met arthritis en met chronische anemie bij immuundeficiënte patienten. Infecties kunnen ook onder  
5 andere ziektebeelden voorkomen of geheel asymptomatisch verlopen.

Infecties met het over de gehele wereld voorkomende virus treden doorgaans op in epidemieën die ongeveer om de 3-6 jaar plaatsvinden, maar kunnen ook sporadisch optreden in tussen-  
10 liggende jaren. Thans, veertien jaar na de ontdekking van het B19-virus, wordt de diagnostiek naar infectie met het virus nog steeds slechts in een beperkt aantal laboratoria ter wereld verricht. Omdat het virus op het moment dat de ziekteverschijnselen optreden niet meer bij de patienten aantoonbaar is  
15 (viremie en virusuitscheiding gaan aan de symptomen vooraf), moet de diagnostiek zich richten op het aantonen van B19-specifieke (IgM)-antistoffen.

Hiertoe (en bijv. ook voor de bereiding van geschikte vaccins) is het noodzakelijk dat men kan beschikken over  
20 voldoende aanbod van B19-antigeen voor het opzetten van de testen. Een geschikt in-vitro-celkweekstelsel voor het vermenigvuldigen van het virus, waarmee voldoende antigeen kan worden verkregen, is echter niet beschikbaar.

De huidige parvovirus B19-diagnostiek wordt uitgevoerd met  
25 virusantigeen dat min of meer toevallig ter beschikking komt (screening van bloeddonoren biedt een kans van naar schatting 1 op 50.000 op het aantreffen van viremisch bloed).

Om deze redenen bestaat er grote behoefte aan antigeen dat met behulp van recombinant DNA technieken wordt geproduceerd. Er  
30 zijn dan ook reeds verschillende voorstellen in deze richting gedaan, maar geen daarvan is echt bruikbaar gebleken voor het construeren van een diagnostische test.

De onderhavige uitvinding berust op het gebruik van een tamelijk recent ontwikkeld expressievector systeem, nl. het  
35 "Baculovirus Expressievector Systeem". In dit systeem wordt gebruik gemaakt van een recombinante virusvector van het baculovirus Autographica californica nuclear polyhedrosis virus

(AcNPV) om de B19 viruseiwitten tot expressie te brengen in insektencellen: Spodoptera frugiperda (Sf9). Dit systeem biedt vele voordelen ten opzichte van de gangbare systemen van expressievectoren:

- 5 a) Met het oog op toepassing voor diagnostische en eventueel therapeutische (vaccinatie) doeleinden is geen kruisreactiviteit te verwachten tegen eiwitten van het baculovirus of de insektencellen (bij eiwitten die in E.coli tot expressie gebracht worden, is dit niet altijd uit te sluiten).
- 10 b) De viruseiwitten kunnen in grote hoeveelheden geproduceerd worden (1-500 mg/l) tot zelfs 50-75% van het totale eiwit, gedetecteerd op SDS-polyacrylamidegel (Summers en Smith, 1986, a manual of methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures; Yong Kang, 1988; Adv. in Virus Res. 15 35, 177-192). Dit zijn aanmerkelijk grotere hoeveelheden dan de productie in prokaryote expressiesystemen of in chinese hamster ovarium cellen, zoals beschreven door Kajigaya et al (Blood 72(5), suppl.1, 44a, abstr. 86; 1988).
- 20 c) De eiwitten kunnen als non-fusieeiwitten worden geproduceerd, in tegenstelling tot bijvoorbeeld het B19-eiwit, dat als fusieeiwit in E.coli geproduceerd is door Sisk en Berman (Biotechnology 5, 1077-1080, 1987). Dit recombinante  $\beta$ -galactosidase-B19 fusieeiwit gaat alleen in oplossing bij aanwezigheid van natriumdodecylsulfaat (SDS). De volgens de 25 uitvinding in insektencellen tot expressie gebrachte eiwitten VP1 en VP2 kunnen daarentegen gemakkelijk in oplossing worden gebracht door sonificatie van de cellen in een buffer, die 25 mM NaHCO<sub>3</sub> en 20 mg/l NaN<sub>3</sub> (pH 9,5) bevat. Bij een dergelijke behandeling gaat 95% van de cellulaire eiwitten 30 over in de oplosbare supernatant fractie.
- 35 d) De eiwitten kunnen worden geproduceerd in een gemakkelijk kweekbare insektencellijn, in tegenstelling tot de productie van viruseiwitten in humane erythroïde beenmergcellen (Ozawa et al, 1987; Blood 70, 384-391) of humane foetale erythroïde levercellen (Yaegashi et al, 1989; J. Virol. 63, 2422-2426).
- e) Omdat in het baculovirus expressievector systeem pre- en posttranslatie modificaties optreden, zoals fosforylering,

glycosylering, signaalpeptide-afsplitsing en het verwijderen van introns door splicing, is het systeem potentieel zeer geschikt voor de produktie van biologisch actieve eiwitten met een (vrijwel) natieve structuur (Yong Kang, 1988; Adv. in Virus Res. 35, 177-192). In dit systeem kunnen VP1 en VP2 van B19 zowel afzonderlijk als gezamenlijk tot expressie gebracht worden. Bovendien bestaat de mogelijkheid dat spontaan virus-achtige deeltjes uit een of meer van deze eiwitten worden gevormd.

- 5 f) Een bijkomend voordeel van het baculovirus is, dat het zich niet vermenigvuldigt in zoogdiercellen en dus niet pathogeen is voor de mens, wat het werken met en het gebruiken van dit systeem veel veiliger maakt.

Volgens de uitvinding is het daadwerkelijk gelukt om de manteleiwitten VP1 en VP2 van het humane parvovirus B19 in een antigenisch werkzame vorm als non-fusieeiwitten in een hoge opbrengst te produceren, al dan niet als virus-achtige partikels, met behulp van het baculovirus expressie systeem in insektencellen (Spodoptera frugiperda). Voorts is het gelukt om met de B19 viruseiwitten producerende insektencellen een specifieke en gevoelige immunofluorescentie-assay (IFA) en een specifieke en gevoelige Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) te ontwikkelen voor de detectie van tegen de B19 viruseiwitten gerichte antilichamen. Op basis van de conform de uitvinding in insektencellen geproduceerde B19 viruseiwitten en virus-achtige partikels kunnen echter ook andere diagnostische assays worden ontwikkeld, zoals bijv. een Radio-Immuno-Assay (RIA) of een agglutinatietest.

De uitvinding wordt in de eerste plaats belichaamd in recombinant VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP1 en/of VP2 benodigde genetische informatie. De uitvinding strekt zich ook uit over recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP2 eiwit of uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een

baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van VP2 eiwit resp. van VP1 en VP2 eiwit benodigde genetische informatie.

Verder wordt de uitvinding belichaamd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is.

De uitvinding verschaft voorts een werkwijze voor het produceren van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 (eventueel in de vorm van virus-achtige partikels, die uit VP2 eiwit of uit beide eiwitten zijn opgebouwd) door Spodoptera frugiperda cellen te kweken, die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van het B19 viruseiwit resp. de B19 viruseiwitten benodigd is. Desgewenst en bij voorkeur worden het in de cellen gevormde B19 viruseiwit en/of de in de cellen gevormde virus-achtige partikels, die uit VP2 eiwit of uit VP1 en VP2 eiwit bestaan, uit de cellen geïsoleerd. Een daartoe geschikte methode bestaat uit een sonificatie van de cellen in een buffer, die 25 mM NaHCO<sub>3</sub> en 20 mg/l NaN<sub>3</sub> (pH 9,5) bevat. Een dergelijke behandeling heeft tot gevolg, dat de in de cellen aanwezige eiwitten voor een groot gedeelte, bijv. voor 95%, in opgeloste vorm in de supernatant worden verkregen. Door op zichzelf bekende opzuiveringsmethodieken kunnen de B19 virus-eiwitten in een hogere zuiverheid worden geïsoleerd.

De uitvinding wordt ook belichaamd in recombinante baculovirus expressievectoren, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is. Voorkeursuitvoeringsvormen van dergelijke recombinante baculovirus expressievectoren zijn de verder te beschrijven plasmiden pAcB19VP1-YM1 en pAcB19VP2-YM1.

Tevens wordt de uitvinding belichaamd in recombinante baculovirussen, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is. Voorkeursuit-

voeringsvormen van dergelijke recombinante baculovirussen zijn de verder te beschrijven virussen AcB19VP1L en AcB19VP2L.

De uitvinding strekt zich verder uit tot het gebruik van recombinant VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.

De uitvinding omvat het gebruik van recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP2 eiwit of uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 virus gerichte antilichamen. In voorkeursuitvoeringsvormen van de uitvinding gaat het hierbij om het gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen, meer in het bijzonder in een IFA of ELISA voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.

Ook strekt de uitvinding zich uit over een vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19, omvattende recombinant VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, of een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit, in combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen, alsmede over een vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die

bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19, omvattende recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP2 eiwit of uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een

5 baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, in combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen.

De uitvinding omvat tevens het gebruik van recombinant VP1  
10 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 (of uit VP2 of uit VP1 en VP2 bestaande virus-achtige partikels), gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, of van een  
15 antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19.

De uitvinding omvat ook het gebruik van virus-achtige partikels, bestaande uit VP2 eiwit of VP1 en VP2 eiwit van het  
20 humane parvovirus B19, waarin een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd, voor het induceren van een immuunrespons die bescherming verleent tegen deze andere pathogenen.

In het hiernavolgende experimentele gedeelte wordt bij  
25 wijze van toelichting getoond hoe de uitvinding in praktijk is gebracht en in praktijk kan worden gebracht. Zoals uit de voorbeelden blijkt, werden de DNA sequenties, coderend voor de structurele eiwitten VP1 en VP2 van het humane parvovirus B19, geïsoleerd uit het B19-virus uit het serum van een patient.  
30 Vervolgens werd via subcloneringsstappen in pUC19 en pUC7 het B19-DNA gecloneerd in de baculovirusvector pAcYM1 achter de promoter voor het polyhedrine-gen van het baculovirus. Door middel van cotransfectie van deze recombinantvector met wildtype baculovirus DNA en daarop volgende recombinatie in de insekten-  
35 cellen (Spodoptera frugiperda) werd tenslotte recombinant virus geïsoleerd, dat na infectie in de insecetencellen leidde tot de produktie van de manteleiwitten VP1 en VP2 van B19, al dan niet



in de vorm van virus-achtige partikels. Met behulp van deze B19-eiwitten zijn gevoelige en specifieke IFA en ELISA tests ontwikkeld, waarmee op snelle en eenvoudige wijze B19-specifieke antilichamen kunnen worden gedetecteerd. De op deze wijze geproduceerde eiwitten, al dan niet in de vorm van virus-achtige partikels, kunnen eveneens dienen als eenvoudig te verkrijgen antigenen voor andere diagnostische tests zoals RIA's en agglutinatietests en voor de (mogelijke) produktie van vaccins en subunit-vaccins.

#### Figuurbeschrijving

Figuur 1 toont de genetische structuur van het humane parvovirus B19, dat een enkelstrengs DNA virus met een DNA van ongeveer 5500 nucleotiden is. Volgens Ozawa et al 1987; J. Virol. 61, 2395-2406 bevatten de nucleotiden 2444-4787 de voor VP1 (84 kd) coderende sequentie en bevatten de nucleotiden 3125-4787 de voor VP2 (58 kd) coderende sequentie. Niet weergegeven zijn de 4 splicing donor-sites, gelegen tussen de nucleotiden 2177 en 2195, en de 2 acceptor-sites, gelegen tussen de nucleotiden 3043 en 3050. Voor de produktie van VP2 tijdens de virus-replicatie wordt de tussenliggende sequentie (nucleotiden 2177-3050, waarin zich onder andere het startcodon voor VP1 bevindt) door splicing verwijderd.

Figuur 1 toont verder het cloneringschema voor de constructie van recombinant baculovirus met humaan parvovirus B19 genen.

#### Voorbeeld 1: Expressie van parvovirus B19 VP1.

1. Isolatie van parvovirus B19 DNA uit patientenserum. Nadat in het serum van een patient B19 DNA was aangetoond door middel van de "polymerase chain reaction" en Dot-Spot-Hybridisatie met B19-specifieke DNA probes (Salimans et al, 1989; J. Virol. Meth. 23, 19-28) werd het B19 DNA hieruit geïsoleerd door incubatie met proteïnase K en SDS (1 ml serum werd 2 uur bij 37°C geïncubeerd met 100 µg proteïnase K in een buffer, die 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 5 mM EDTA en 0,5% SDS

bevatte), phenol-extractie om het eiwit te verwijderen en DNA precipitatie door middel van ethanol. Het DNA werd gecontroleerd op grootte, restrictieenzym patronen en southern blot analyse (Maniatis et al, 1982; Molecular cloning: a laboratory manual.

5 Cold Spring Harbor, N.Y.) met B19-specifieke DNA probes.

## 2. Subcloneren in pUC19 (figuur 1).

De technieken voor de manipulaties met B19-DNA en plasmide-DNA werden in essentie uitgevoerd zoals beschreven is door Maniatis  
10 et al (1982; Molecular cloning: a laboratory manual). Het B19 DNA werd geknipt met HindIII (bp 2430) en ScaI (bp 4920) en in pUC19 (geknipt met HindIII en SmaI) geligeerd teneinde een grotere hoeveelheid van de coderende sequentie te verkrijgen. (Door ScaI in SmaI te ligeren werd deze knipplaats verwijderd).  
15 Het verkregen plasmide (pUC19-B19VP1) werd gecontroleerd door restrictieenzym analyse en hybridisatie en getransformeerd naar en vermenigvuldigd in E.coli JM101.

## 3. Subcloneren in pUC7 (figuur 1).

20 Om aan de uiteinden van het B19 DNA BamHI-sites te creëren, werd het DNA gecloneerd naar pUC7, dat een symmetrische poly-linker bevat met twee BamHI-sites. Het B19 DNA werd uit pUC19 geknipt met HindIII en EcoRI en tevens met ScaI om het restant van het vector-DNA te verwijderen. Het B19 DNA fragment met de  
25 juiste lengte werd uit agarosegel geïsoleerd, ingevuld met "Klenow large fragment polymerase" en geligeerd met HincII geknipt pUC7 plasmide (eveneens blunt uiteinden). Het geligeerde DNA (PUC7-B19VP1) werd getransformeerd naar en vermenigvuldigd in E.coli JM101. Afzonderlijke colonies werden getest op de  
30 aanwezigheid van B19 DNA door middel van restrictieenzym analyse en hybridisatie met een B19 specifieke DNA probe (het 700bp PstI-fragment van B19, Salimans et al, 1989; J. Virol.Meth. 23, 19-28).

## 35 4. Cloneren in de baculovirus-vector pAcYM1 (figuur 1).

De technieken voor manipulaties met het baculovirus, de baculovirusvector en de insektencellen werden in essentie

uitgevoerd als beschreven door Summers en Smith in 1986 (a manual of methods for baculovirusvector and insect cell culture procedures). De restrictie-site achter de polyhedrinepromoter van het baculovirus is een BamHI-site. Aangezien het B19 DNA ook een interne BamHI-site bevat werd voor de volgende strategie gekozen: het B19 DNA werd uit pUC7 geknipt met EcoRI en het resterende deel van pUC7 werd geknipt met ScaI (deze ScaI digestie is niet noodzakelijk voor cloneren van VP2 DNA). Het B19 DNA werd uit de gel geïsoleerd, gedefosforyleerd met Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) en tenslotte werd een partiële digestie uitgevoerd met BamHI. Het BamHI-fragment met de juiste lengte (2,5 kb voor VP1 en 1,8 kb voor VP2) werd vervolgens geligeerd met, met BamHI geknipte en CIP behandelde baculovirusvector, pAcYM1 (Matsuura et al, 1987; J. Gen. Virol. 68, 1233-1250). Het aldus verkregen plasmide (pAcB19VP1-YM1) werd in E.coli HB101 vermenigvuldigd. Recombinante plasmiden werden gecontroleerd op de aanwezigheid van B19 DNA (met specifieke B19 DNA probes) en de juiste orientatie hiervan ten opzichte van de polyhedrine promotor (door middel van restrictieenzym analyse). Constructen met de juiste orientatie werden opgekweekt en geïsoleerd uit de bacteriecellen volgens "the rapid boiling" methode van Holmes en Quigley (1981; Anal. Bioch. 114, 193-197) met een laatste zuivering op een CsCl-gradient.

5. Cotransfectie met wildtype baculovirus DNA:AcNPV (figuur 1). Door middel van een cotransfectie van het pAcB19VP1-YM1 construct met wildtype baculovirus DNA (AcNPV) werd het DNA in de insektencellen (Spodoptera frugiperda-Sf) gebracht (volgens methode II van Summers en Smith, 1986; a manual of methods for baculovirusvector and insect cell culture procedures). In 0,5-3,0% van de infecties recombineert de recombinant vector (pAcB19VP1-YM1) met het wildtype virus DNA tijdens de opname in de cellen, aldus een recombinant virus genererend, dat het B19 DNA bevat: AcB19VP1L. Het polyhedrine-gen is vervangen door het VP1 DNA (in voorbeeld 2, waarin de vorming van een recombinant virus AcB19VP2L wordt beschreven, door het VP2 DNA).

6. Zuiveren van recombinant-virus (AcB19VP1L, resp. AcB19VP2L). De titer van het virus (wildtype zowel als recombinant) geproduceerd door de Sf-cellen werd bepaald door middel van een plaque-assay. Twintig plaque-forming units (pfu) werden op een monolaag van Sf-cellen in een 96-well plaat gebracht (20 pfu/well) en geïncubeerd bij 27°C. Drie dagen na de infectie werden de supernatanten verwijderd en bewaard en de cellen gelyseerd en gespot op nitrocellulose (Pen et al, 1989; Nucl. Acid Res. 17, 451). Met een parvovirus B19 specifieke DNA probe werd gescreend op de aanwezigheid van recombinant virus. De titer van de verzamelde supernatanten van recombinant virus bevattende wells werd door middel van een plaque-assay bepaald en vervolgens uitverdund tot 1 pfu/well op een 96-well plaat. Na een screening als hierboven beschreven met de dot-spot-hybridisatie-assay werd van de positieve supernatanten in een plaque-assay de titer bepaald en bovendien met een microscoop gescreend op de afwezigheid van het polyhedrine eiwit in de plaques, aangevend dat de plaque recombinant virus bevat. Deze plaques werden geënt op een Sf-monolaag in een 96 well plaat. Na drie dagen werd weer een dot-spot-hybridisatie uitgevoerd en positieve wells werden in een plaque-assay gecontroleerd. De recombinanten werden als zuiver beschouwd wanneer minder dan 1 op de 500 plaques wildtype virus bevatte.
7. Controle van het recombinant virus (AcB19VP1L). Uit cellen, geïnfecteerd met recombinant virus, werd totaal DNA geïsoleerd, geknipt met restrictieenzymen en na southern blotting gecontroleerd door hybridisatie met parvovirus B19 specifieke DNA probes.
- Zuiver recombinant virus werd gebruikt om insektencellen (Sf) te infecteren met een m.o.i. (multiplicity of infection) van 1-5 en parvovirus VP1 en VP2 in deze cellen tot expressie te brengen. Vervolgens werden de manteleiwitten VP1 en VP2 van het humane parvovirus B19, geproduceerd in het baculovirus expressievector systeem, geanalyseerd en gecontroleerd met de hieronder beschreven technieken:

#### 8. Biosynthese van recombinant VP1.

Twee dagen na infectie met recombinant virus (AcB19VP1L, m.o.i. 5) werden insektencellen ( $10^6$  Sf-cellen in 35mm-petrischaal) gedurende 4 uren gekweekt bij  $27^{\circ}\text{C}$  in methioninevrij "Grace"-  
5 medium waaraan 100 uCi  $^{35}\text{S}$ -methionine was toegevoegd, om de "de novo" synthese van eiwitten te bepalen. Nadat de supernatant was verwijderd, werden de cellen opgenomen in PBS (phosphate buffered saline). Zowel supernatant als celfraktie werden  
10 opgenomen in lyserende buffer, gedurende 5 minuten gekookt en op een 10% SDS-polyacrylamidegel geanalyseerd. Dezelfde experimenten werden uitgevoerd met ongeïnfecteerde en wildtype baculovirus geïnfecteerde cellen. Na autoradiografie (niet  
15 getoond) bleek dat de polyhedrineband (30kd), die bij de wildtype infectie sterk overheerste, verdween bij de recombinant virussen en dat een eiwit ter grootte van het VP1 van B19 (84kd) werd gesynthetiseerd.

#### 9. Analyse op SDS-PAGE.

Spodoptera frugiperda cellen werden na infectie met recombinant  
20 virus (m.o.i.5) gedurende vijf dagen geanalyseerd op de produktie van VP1 van B19-virus op 10% SDS-polyacrylamidegel. De gels werden gekleurd met "fast green". Uit de (niet getoonde) gelresultaten bleek, dat VP1 in grote hoeveelheden vanaf dag 2 werd geproduceerd als een stabiel produkt, dat ook na 5 dagen  
25 nog duidelijk aanwezig was. VP1 werd in vergelijkbare hoeveelheden geproduceerd als het polyhedrine-eiwit in wildtype baculovirus geïnfecteerde cellen.

#### 10. Antigeniciteit van de geproduceerde eiwitten.

30 100 ng eiwit van cellysaten van Sf-cellen 2 dagen na infectie (m.o.i.5) werd geëlectroforeerd op 10% SDS-polyacrylamidegel en geblot naar nitrocellulose (3 uur; 70V in 25mM Tris, 192 mM glycine en 20% methanol). Vervolgens werden 20 humane sera getest op reactiviteit met het recombinant VP1 antigeen (15 IgG-  
35 positieve sera en 5 IgG negatieve sera). De reacties werden bij kamertemperatuur uitgevoerd: overnacht blokkade door incubatie van het nitrocellulosefilter in PBS/ 5% Foetal Calf Serum (FCS)/

0.05% Tween 20; incubatie met sera (1:500 verdunning voor de positieve sera en 1:50 verdunning voor de negatieve sera) verdund in PBS/ 5% FCS gedurende 1,5 uur; daarna wassen van de filters gedurende 1 uur met PBS/ 0,05% Tween 20 en vervolgens  
 5 incuberen met 1:500 verdund alkalisch phosphatase gelabeld geit-anti-mens-totaal Ig (Tago, cat.no.:2493) in PBS/ 0.05% Tween 20/ 5%FCS; na 2x wassen in PBS/ 0,05% Tween 20 en 2x in PBS werden gebonden antilichamen gedetecteerd met 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfaat (BCIP). De 15 positieve IgG sera reageerden alle  
 10 met de recombinant-VP1 band op de gel en de 5 negatieve IgG sera gaven geen reactie.

11. Testen van sera in een immuno-fluorescentie-assay.  
 Sf-cellen, geïnfecteerd met recombinant virus (AcB19VP1L, m.o.i.1), werden na 3-4 dagen opgenomen in TC100 medium (Gibco-BRL), met ongeïnfecteerde cellen gemengd tot een percentage van  
 15 ongeveer 25% B19 recombinant VP1 bevattende cellen en gespot op 18 well-glaasjes (nutacon, cat.no.10-404) met een concentratie van ongeveer 5000 cellen/well (5 ul) en na drogen aan de lucht gefixeerd in 100% aceton gedurende 20 minuten bij -20°C.  
 20 Vervolgens werden de cellen geïncubeerd met humane sera (positieve en negatieve sera voor B19-Ig) bij verschillende verdunningen in VBS (veronal buffered saline). Deze sera werden voorbehandeld met leverpoeder voor een reductie van mogelijke  
 25 achtergrondkleuring. Na incubatie gedurende 1-2 uren bij 37°C werden de glaasjes gewassen in PBS en aan de lucht gedroogd voordat geïncubeerd werd met een 1:40 verdunning van FITC-gelabeld geit-anti-mens-IgG (Kallestad, cat.no.:104) in VBS met  
 30 1:500 "Evans Blue" (Hoffmann La Roche). Na wassen in PBS en drogen aan de lucht werd Tris/glycerol buffer (1g Tris in PBS, 80% glycerol, pH 9,9) toegevoegd en geanalyseerd onder de UV-microscoop. In B19-IFA's met positieve patienten-sera waren de fluorescerende cellen waarneembaar. De bruikbaarheid van de B19-IFA werd in een aantal onderbeschreven experimenten getest:

a) "Dubbel-blind" experiment.

30 patienten sera werden volgens de procedure in 1:50 en 1:500 verdunningen getest, waarbij voor de "onderzoeker" onbekend was welke van de sera positief of negatief waren. Na aflezing door  
5 meerdere medewerkers werden de uitslagen vergeleken met de data uit de RIA-test (Cohen et al, 1983; J. Hyg. 91, 113-130): alle 17 IgG-positieve sera werden in de B19-IFA als positief afgelezen en alle 13 IgG-negatieve sera als negatief.

10 b) Titratie.

Van een aantal B19-antilichaam positieve sera (positief volgens de testresultaten van de RIA, uitgevoerd met uit serum geïsoleerd virus als antigeen, Cohen et al, 1983; J. Hyg. 91, 113-130) werd een IFA-titer bepaald. De resultaten zijn  
15 weergegeven in tabel 1. Uit de data blijkt, dat deze B19-IFA overeenkomstige resultaten geeft met de RIA gegevens: sera met hoog positieve waarden in de RIA hebben ook in de B19-IFA hoge titers en sera met laag positieve waarden in de RIA geven lagere titers in de B19-IFA.

20

Tabel 1: Vergelijking tussen RIA en IFA voor de bepaling van B19 antilichamen

|    | IgG        |             | IgM        |             |
|----|------------|-------------|------------|-------------|
|    | RIA (a.u.) | IFA (titer) | RIA (a.u.) | IFA (titer) |
| 5  | 100        | 8 192       | >100       | 1 280       |
|    | 100        | >16 384     | 88         | 1 280       |
|    | 91         | >16 384     | 50         | 1 280       |
|    | 70         | 8 192       | 31         | 2 560       |
| 10 | 55         | 8 192       | 25         | 1 280       |
|    | 40         | 8 192       | 16         | 640         |
|    | 25         | 8 192       | 16         | 320         |
|    | 15,5       | 4 096       | 8,3        | 40          |
|    | 11         | 4 096       | 5,3        | <10         |
| 15 | 8,4        | 1 024       | 5          | 80          |
|    | 7,6        | 512         | 4,4        | 10          |
|    | 4,2        | 512         | 4,1        | 40          |
|    | 4,0        | 512         | 3,1        | 10          |
|    | 2,5        | <32         | 3,4/2,9    | <10         |
| 20 | 1,8        | 128         | 3,3        | 160         |
|    | 1,2        | <32         | 2,3/1,9    | <10         |
|    | <1         | <32         | 1,6        | <10         |
|    | <1         | <32         | <1         | <10         |
|    | <1         | <32         | <1         | <10         |

25

a.u. = arbitrary units; <1 = negatieve waarde RIA; <32 = negatieve waarde IFA bij laagste verdunning van IgG; <10 = negatieve waarde IFA bij laagste verdunning van IGM.

### 30 c) Screening van donoren.

100 willekeurig geselecteerde bloeddonaoren werden gescreend op de aanwezigheid van B19-specifieke IgG antilichamen en uit de resultaten bleek, dat in deze B19-IFA 76% van de donoren positief waren, wat zeer wel overeenstemt met de gegevens zoals  
35 die voor het humane parvovirus B19 beschreven zijn voor deze leeftijdsgroep.



Voorbeeld 2: Expressie van parvovirus B19 VP2.

Subcloneren van VP2 in pUC7.

Voor de clonering van het VP2 van parvovirus B19 werd uitgegaan  
5 van het B19 DNA dat in pUC19 is gecloneerd volgens de procedure  
zoals beschreven in voorbeeld 1 onder punten 1 en 2. Een 1,8 kb  
fragment, coderend voor VP2, werd met HpaII (bp3083) en EcoRI  
uit het pUC19 construct (pUC19-B19VP1) geknipt, uit agarosegel  
geïsoleerd, ingevuld met "Klenow large fragment DNA polymerase"  
10 en geligeerd met, met HincII geknipt pUC7 plasmide. Het nieuwe  
pUC7 construct (pUC7-B19VP2) werd vervolgens vermenigvuldigd in  
E.coli JM101. Bacteriecolonies werden vervolgens getest op de  
aanwezigheid van een B19-insertie door middel van restrictie-  
enzymanalyse en hybridisatie met een B19 specifieke DNA probe  
15 (Salimans et al, 1989; J. Virol. Meth. 23, 19-28). Verder werd  
dezelfde procedure gevolgd zoals beschreven is voor VP1 in voor-  
beeld 1 onder punten 4-7 om recombinant baculovirus met het DNA  
coderend voor VP2 van het humane parvovirus te genereren en VP2  
te produceren in de insektencellen (AcB19VP2L).

20  
Voorbeeld 3: Expressie van parvovirus B19 VP1 en VP2 met behulp  
van dubbele infectie van insektencellen

Twee dagen na infectie met de recombinante virussen (AcB19VP1L  
25 en AcB19VP2L, m.o.i. 5) werden insektencellen ( $10^6$  Sf-cellen in  
35mm-petrischaal) gedurende 4 uren gekweekt bij 27°C in  
methioninevrij "Grace"-medium waaraan 100 uCi  $^{35}\text{S}$ -methionine was  
toegevoegd, om de "de novo" synthese van eiwitten te bepalen.  
Nadat de supernatant was verwijderd, werden de cellen opgenomen  
30 in PBS (phosphate buffered saline). Zowel supernatant als cel-  
fractie werden opgenomen in lyserende buffer, gedurende 5 min  
gekookt en op een 10% SDS-polyacrylamidegel geanalyseerd.  
Dezelfde experimenten werden uitgevoerd met ongeïnfecteerde en  
wildtype baculovirus geïnfecteerde cellen. Na autoradiografie  
35 (niet getoond) bleek dat de polyhedrineband (30kd), die bij de  
wildtype infectie sterk overheerste, verdween bij de met de  
recombinant virussen geïnfecteerde cellen en dat eiwitten ter

grootte van het VP1 (84 kD) en het VP2 (58 kD) van B19 werden gesynthetiseerd. De resultaten werden bevestigd door SDS-PAGE analyse, zoals beschreven in voorbeeld 1 onder punt 9.

5 Voorbeeld 4: Produktie en zuivering van VP2 capside eiwit van humaan parvovirus stam B19

Sf-cellen werden met het VP2-recombinant baculovirus geïnfecteerd (m.o.i. 20). De cellen werden 72 uur na het  
10 inzetten van de infectie in PBS gewassen, geoogst en vervolgens in PBS gesoniceerd. Cel debris werd verwijderd d.m.v. centrifugatie (10 min, 1 000 x g), waarna het supernatant op een 40% sucrose kussen werd gebracht en gedurende 2.5 uur bij 100 000 x g werd gecentrifugeerd. De pellet werd geresuspendeerd  
15 in PBS en vervolgens op een lineaire sucrose gradient (15-30%, w/w) gescheiden. Na centrifugatie gedurende 2.5 uur bij 110 000 x g werd een opalescente band waargenomen. Materiaal uit deze band werd d.m.v. elektronenmicroscopie onderzocht. Er werden  
20 partikels aangetroffen die wat betreft diameter (ongeveer 21 nm) en morfologie grote overeenkomst vertoonden met het parvovirus capside. Na analyse van de sucrose gradient fractie d.m.v. SDS-PAGE en zilverkleuring werd een eiwit gevonden ter grootte van VP2 (58K). Door middel van radio immunoprecipitatie en Western blot analyse met een humaan serum, specifiek voor parvovirus  
25 B19, werd aangetoond dat het hier inderdaad om het VP2-eiwit gaat. Het feit, dat na zilverkleuring geen andere eiwitten gedetecteerd werden, duidt op een grote mate van zuiverheid. De hoeveelheid eiwit in de voor de partikels verrijkte gradient fracties werd bepaald d.m.v. de Bradford procedure. Op grond van  
30 de verkregen gegevens werd het aantal partikels per geïnfecteerde insektencel geschat op ten minste  $10^5$ . Hierbij werd verondersteld dat elk partikel is opgebouwd uit 60 molekulen.

Om na te gaan of de gezuiverde VP2 partikels gebruikt kunnen worden voor het opzetten van een diagnostische test werd een  
35 ELISA uitgevoerd met 8 B19-positieve en 3 B19-negatieve humane sera. In tabel 2 worden de resultaten vergeleken met die, welke verkregen werden voor gezuiverd recombinant VP1 eiwit. Alle B19-

positieve sera herkenden de VP2 capsides. Bovendien bleek voor zeven van de acht sera de reactie met de VP2-capsides sterker positief dan die met het gezuiverde VP1 eiwit.

- 5 Tabel 2: ELISA voor het aantonen van parvovirus-specifieke antilichamen in 11 humane sera met recombinant VP1 en VP2 eiwit als antigeen

| 10 | Extinctie* | aantal sera   |               |
|----|------------|---------------|---------------|
|    |            | gezuiverd VP1 | VP2 partikels |
|    | <0,5       | 3             | 3             |
|    | 0,5-1,0    | 2             | 0             |
|    | 1,0-2,0    | 5             | 0             |
|    | >2,0       | 1             | 8             |

15

\* Extinctie <0,5: negatief; >0,5: positief

CONCLUSIES

1. Recombinant VP1 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP1 benodigde genetische informatie.
2. Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is.
3. Werkwijze voor het produceren van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 door Spodoptera frugiperda cellen te kweken, die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van het B19 viruseiwit VP1 benodigd is.
4. Werkwijze volgens conclusie 3, waarbij het in de cellen gevormde B19 viruseiwit uit de cellen wordt geïsoleerd.
5. Recombinante baculovirus expressievector, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.
6. Recombinante baculovirus expressievector pAcB19VP1-YM1.
7. Recombinant baculovirus, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.
8. Recombinant baculovirus AcB19VP1L.
9. Gebruik van recombinant VP1 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP1 benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit VP1 gerichte antilichamen.

10. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een assay voor het in  
5 een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit VP1 gerichte antilichamen.
11. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van  
10 het humane parvovirus B19 benodigd is, in een IFA of ELISA voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit VP1 gerichte antilichamen.
12. Vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19,  
15 omfattende recombinant VP1 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP1 benodigde genetische informatie, of een antigeen werkzaam deel van dit recombinante  
20 B19 viruseiwit VP1, in combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen.
13. Gebruik van recombinant VP1 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de  
25 voor expressie van het B19 viruseiwit VP1 benodigde genetische informatie, of van een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit VP1, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19.
- 30 14. Recombinant VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP2 benodigde genetische informatie.
- 35 15. Recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressie-

vector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP2 benodigde genetische informatie.

16. Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de  
5 genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is.

17. Werkwijze voor het produceren van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, en/of van virus-achtige partikels, die bestaan uit VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, door Spodoptera  
10 frugiperda cellen te kweken, die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van het B19 viruseiwit VP2 benodigd is.

18. Werkwijze volgens conclusie 17, waarbij het in de cellen gevormde B19 viruseiwit VP2, en/of virus-achtige partikels, die  
15 bestaan uit VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, uit de cellen worden geïsoleerd.

19. Recombinante baculovirus expressievector, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van  
20 het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.

20. Recombinante baculovirus expressievector pAcB19VP2-YM1.

21. Recombinant baculovirus, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van het humane  
25 parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.

22. Recombinant baculovirus AcB19VP2L.

23. Gebruik van recombinant VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, en/of van virus-achtige partikels, die bestaan uit VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera  
30 frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP2 benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit VP2 gerichte antilichamen.

35 24. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van

het humane parvovirus B19 benodigd is, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit VP2 gerichte antilichamen.

25. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel  
5 van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een IFA of ELISA voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit VP2 gerichte antilichamen.
- 10 26. Vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19, omvattende recombinant VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, en/of virus-achtige partikels, die bestaan uit VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen  
15 die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP2 benodigde genetische informatie, of een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit VP2, in combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of  
20 hulpstoffen.
27. Gebruik van recombinant VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, en/of van virus-achtige partikels, die bestaan uit VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressie-  
25 vector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit VP2 benodigde genetische informatie, of van een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit VP2, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19.
- 30 28. Recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie.
- 35 29. Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de

genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is.

30. Werkwijze voor het produceren van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, en/of van virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, door Spodoptera frugiperda cellen te kweken, die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigd is.

31. Werkwijze volgens conclusie 30, waarbij de in de cellen gevormde B19 viruseiwitten en/of virus-achtige partikels, die uit deze eiwitten bestaan, uit de cellen worden geïsoleerd.

32. Recombinante baculovirus expressievector, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.

33. Recombinant baculovirus, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.

34. Gebruik van recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 virus gerichte antilichamen.

35. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 virus gerichte antilichamen.

36. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een IFA of ELISA



voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 virus gerichte antilichamen.

37. Vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19,

5   omvattende recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, in  
10   combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen.

38. Gebruik van recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een  
15   baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19.

39. Recombinante virus-achtige partikels, omvattende VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer  
20   epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd, welke partikels zijn gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het gemodificeerde VP2 eiwit  
25   benodigde genetische informatie.

40. Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke benodigd is voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of  
30   meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd.

41. Werkwijze voor het produceren van virus-achtige partikels, omvattende VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd, door Spodoptera frugiperda cellen te kweken, die  
35   door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van het gemodificeerde VP2 eiwit benodigd is.

42. Werkwijze volgens conclusie 41, waarbij de in de cellen gevormde virus-achtige partikels, omvattende VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd, uit de cellen worden geïsoleerd.

43. Recombinante baculovirus expressievector, voorzien van de genetische informatie, welke benodigd is voor expressie in Spodoptera frugiperda cellen van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd.

44. Recombinant baculovirus, voorzien van de genetische informatie, welke benodigd is voor expressie in Spodoptera frugiperda cellen van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd.

45. Gebruik van virus-achtige partikels, omvattende VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd, welke partikels zijn gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het gemodificeerde VP2 eiwit benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen de ingebouwde epitopen gerichte antilichamen.

46. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke benodigd is voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen de ingebouwde epitopen gerichte antilichamen.

47. Vaccinpreparaat, omvattende virus-achtige partikels, omvattende VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd, welke partikels zijn gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van

het gemodificeerde VP2 eiwit benodigde genetische informatie, in combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen deze andere

5 pathogenen.

48. Gebruik van virus-achtige partikels, omvattende VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, in welk VP2 eiwit een of meer epitopen van eiwitten van andere pathogenen zijn ingebouwd, welke partikels zijn gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die

10 door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het gemodificeerde VP2 eiwit benodigde genetische informatie, voor het induceren van een immuunrespons die bescherming verleent tegen deze andere pathogenen.

15

Titel: Humaan parvovirus B19 eiwitten en virus-achtige partikels, hun  
produktie en hun gebruik in diagnostische assays en vaccins.

Korte samenvatting

De uitvinding betreft de manteleiwitten VP1 en VP2 van het humane parvovirus B19 en virus-achtige partikels, die uit VP2 of uit VP1 en VP2 bestaan. De uitvinding betreft tevens genetische informatie in de vorm van recombinante expressievectoren, die de voor deze eiwitten coderende genen bevatten, en organismen die dankzij genetische manipulatie onder toepassing van dergelijke vectoren het vermogen hebben verworven om de desbetreffende eiwitten en/of deeltjes te produceren. De uitvinding strekt zich voorts uit over toepassingen van de desbetreffende eiwitten en virus-achtige partikels voor diagnostiek of vaccinatie.

1 / 1

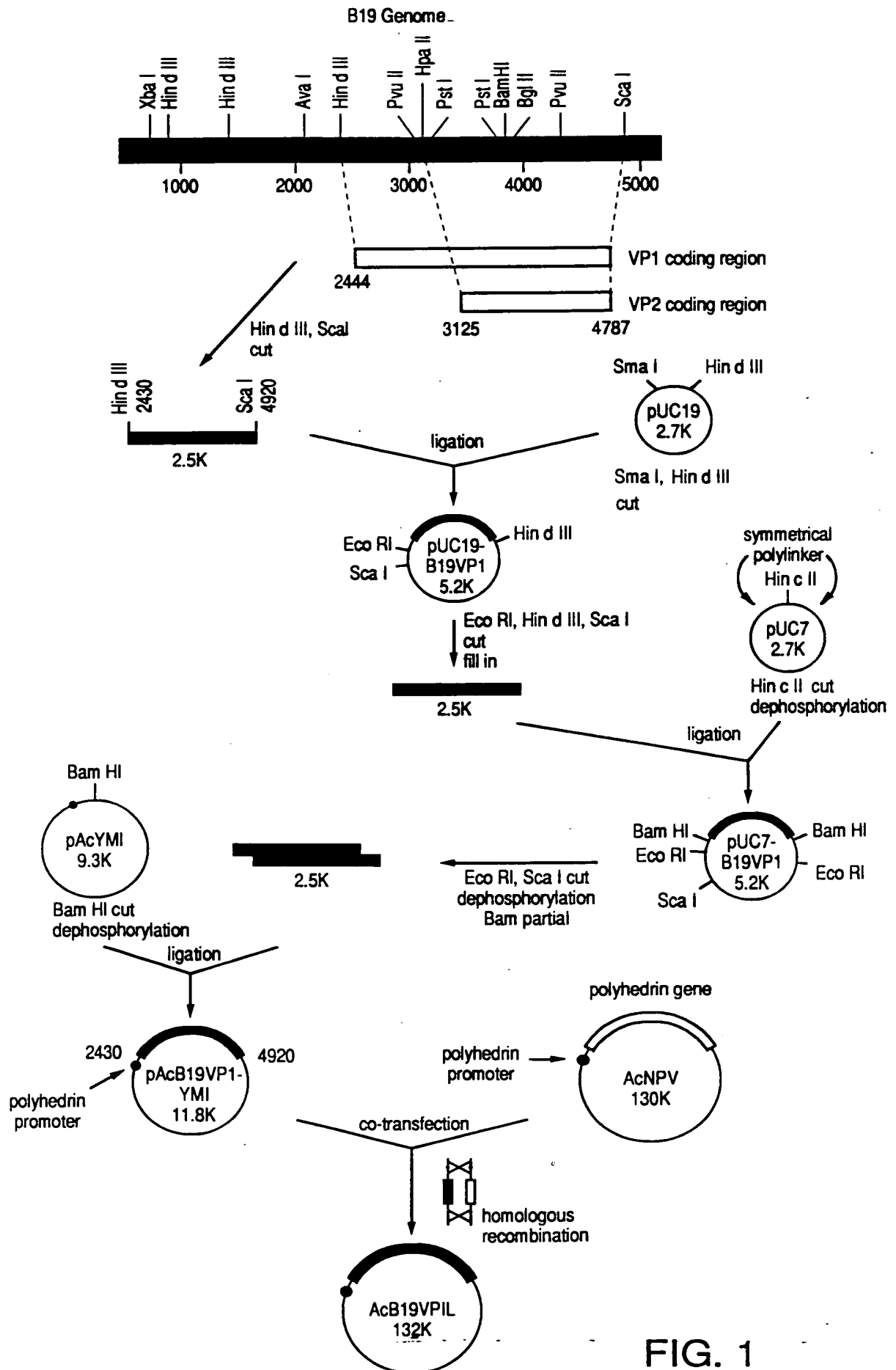
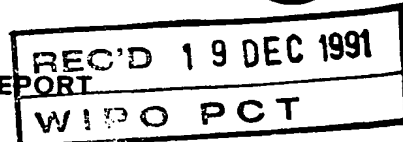


FIG. 1



PATENT COOPERATION TREATY  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT



|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
| <b>IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION</b>  |   | Applicant's or Agent's File Reference<br>PCT 0172 |  |
| International Application No.<br>PCT/NL 90/ 00130   | International Filing Date<br>11/09/1990 | Date demand submitted<br>11/04/1991               |  |
| Receiving Office<br>RO/ NL  | Priority Date Claimed<br>14/09/1989     |   |  |
| Applicant (Name)<br>RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN <i>et al.</i>   |   |   |  |
| <b>BASIS OF REPORT</b>  |   |   |  |
| <b>1. AMENDMENTS AND/OR RECTIFICATIONS</b> <sup>1*</sup> - The amendments and/or rectifications made before this International Preliminary Examining Authority in respect of the claims, the description, and/or drawings in the above-identified International application are annexed to this report. |   |   |  |
| a) <input checked="" type="checkbox"/> This report has been established on the basis of the following application documents:  |   |   |  |
| <input type="checkbox"/> the application documents as filed   |   |   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> description, pages <u>1-18</u> .....  |   |   |  |
| description, pages .....  |   |   |  |
| description, pages .....  |   |   |  |
| description, pages .....  |   |   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> claim(s) .....  |   |   |  |
| claim(s) <u>1-48</u> .....  |   |   |  |
| claim(s) .....  |   |   |  |
| claim(s) .....  |   |   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> drawings, sheet/fig. <u>1</u> .....   |   |   |  |
| drawings, sheet/fig. ....   |   |   |  |
| as originally filed .....   |   |   |  |
| filed with your letter of .....   |   |   |  |
| filed with your letter of .....   |   |   |  |
| filed with your letter of .....   |   |   |  |
| as originally filed .....   |   |   |  |
| filed with your letter of <u>19.08.91</u> .....   |   |   |  |
| filed with your letter of .....   |   |   |  |
| filed with your letter of .....   |   |   |  |
| as originally filed .....   |   |   |  |
| filed with your letter of .....   |   |   |  |
| b) <input type="checkbox"/> The amendments resulted in the cancellation of the following sheets: .....  |   |   |  |
| c) <input type="checkbox"/> This report has been established as if the amendments indicated on the extra sheet have not been made, since, for the reasons indicated, they have been considered to go beyond the disclosure as filed.  |   |   |  |
| <b>2. PRIORITY</b> <sup>2</sup>   |   |   |  |
| a) This report has been established as if no priority has been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:  |   |   |  |
| <input type="checkbox"/> copy of the earlier application whose priority has been claimed.   |   |   |  |
| <input type="checkbox"/> translation of the earlier application whose priority has been claimed.  |   |   |  |
| b) <input type="checkbox"/> This report has been established as if no priority has been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.   |   |   |  |
| Thus, for the purposes of this report, the International filing date indicated above is considered to be the relevant date.   |   |   |  |
| * Where replacement sheets are annexed to this report, a translation of these replacement sheets must be furnished to the elected Offices within the time limit applicable under PCT Article 39(1).   |   |   |  |

## BASIS OF REPORT (Continued)

3. UNITY OF INVENTION<sup>3</sup> — The international application does not comply with the requirement of unity of invention.

a. In response to an invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest. Where requested by the applicant, the text of the protest together with the decision taken thereon are annexed to this report.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

b. ☐ No invitation has been issued. The opinion of this International Preliminary Examining Authority is that the international application does not comply with the requirement of unity of invention for the following reasons. (specify)

c. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☐ the parts relating to the restricted claims, that is claims Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the parts relating to the main invention, that is claims Nos. \_\_\_\_\_

4. NON-ESTABLISHMENT OF REPORT ON QUESTIONS OF NOVELTY, INVENTIVE STEP OR INDUSTRIAL APPLICABILITY<sup>4</sup>

The questions of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step or to be industrially applicable have not for the reasons indicated been gone into in respect of:

a. ☐ the entire international applicationb. ☐ claims Nos. \_\_\_\_\_

for the following reasons:

☐ Said international application, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination. (specify)☐ The description, claims, or drawings (indicate particular elements) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed.☐ The claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.☐ Said claims Nos. \_\_\_\_\_ are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

**CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all.) \***

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

C12N15/35 C12N5/10 C12P21/02 C12N15/86  
G01N33/569 A61K39/23 A61K39/295**REASONED STATEMENT AS TO CLAIMS MEETING CRITERIA OF NOVELTY (N), INVENTIVE STEP (IS) AND INDUSTRIAL APPLICABILITY (IA)\* AND CITATIONS\* AND EXPLANATIONS\* SUPPORTING SUCH STATEMENT**

| CLAIM NUMBER | STATEMENT (CRITERIA)  | CITATIONS AND EXPLANATIONS  |
|--------------|---|-----------------------------|
| 1-48         | N<br>IS<br>IA <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em;">}</div> | Yes      see attached sheet |

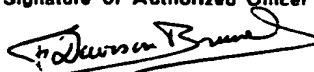


| NON-WRITTEN DISCLOSURES <sup>9</sup> |  |                                |  |
|--------------------------------------|--|--------------------------------|--|
| Kind of Non-Written Disclosure       | Date of Written Disclosure referring to the Non-Written Disclosure | Date of Non-Written Disclosure |  |
|                                      |  |                                |  |

| CERTAIN PUBLISHED DOCUMENTS <sup>10</sup> |                     |             |                             |
|---|---------------------|-------------|-----------------------------|
| Application/Patent                        | Date of Publication | Filing Date | Priority Date (Valid Claim) |
|   |                     |             |                             |

| CERTAIN DEFECTS IN THE INTERNATIONAL APPLICATION <sup>11</sup> |
|--|
|  |

| CERTAIN OBSERVATIONS ON THE INTERNATIONAL APPLICATION <sup>12</sup> |
|---|
|   |

| CERTIFICATION  |   |
|--|---|
| Date Demand Submitted<br><br>11.04.91                    | Date of Completion of the International Preliminary Examination Report<br><br>17.12.91                                  |
| International Preliminary Examining Authority<br><br>EPO | Signature of Authorized Officer<br> |

Reasoned statement as to claims meeting criteria of novelty, inventive step and industrial applicability.

-----

The subject-matter of all claims is novel, because, due to the difficulties encountered in purifying enough human B19 virus, the VP1 and VP2 proteins have never been isolated and are solely known by their sequences, which may be deduced from the already known sequences of the cloned (but not expressed as such) corresponding genes.

The closest prior art is DocA: Biotechnology 5 (1987), pp.1077-1080: Said document discloses that VP1 may be expressed in an E.coli expression system as a fusion protein with galactosidase. The fused entity is, however, of such a high molecular weight that it is not soluble in the absence of detergent.

No prior art seems to exist in relation to an isolated VP2 protein.

The differences between the prior art concerning VP1 and the present application are as follows:

- native protein is obtained in the latter case.
- because of the expression system used, a higher yield is achieved and the protein structure is closely resembling the human VP1 protein.

In other words, although the VP1 DNA and the expression system were known in the state of the art, their combination led to the successful, efficient production of the parvovirus envelope proteins in a form hitherto not obtained and advantageous for setting up detection assays and immunizing compositions against said virus. The inventivity and industrial applicability of the claims can, thus be acknowledged (see, however, next page, par.2).)

Objections under Article 6 PCT.

-----

- 1). Article 6 PCT states that the claims should be clear and concise. This requirement refers to the claims in their entirety as well as to individual claims. Undue repetition of wording between one claim and another should be avoided by the use of the dependent form.  
In the present case, 44 out of 48 claims are independent claims which are "linked" to each other by the expression "Spodoptera frugiperda cells which by means of a baculovirus expression vector system have been provided with the genetic information which is necessary for expression of the B19 virus protein..." or variants thereof.  
To fulfill the requirements of Art.6 PCT, claims 2-13, 15-27, 29-38 and 40-48 should be tailored down and made dependent on claims 1, 14, 28 and 39 respectively.
- 2). For the assessment of the present claims 13, 27, 38 and 48 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT. The patentability can also depend upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable claims to the use of a compound in medical treatment, but will allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

## P A T E N T      C O O P E R A T I O N      T R E A T Y

28 Rec'd PCT/PIU

14 JAN 1992

TO:

United States Patent  
and Trademark Office  
Washington, D.C.

FROM:

the INTERNATIONAL BUREAU of the  
WORLD INTELLECTUAL PROPERTY  
ORGANIZATION

NOTIFICATION CONCERNING  
DOCUMENTS TRANSMITTED

Issued pursuant to PCT  
Article 36(3)(a)

(as elected Office)

Date of Mailing:

20 December 1991 (20.12.91)

## NOTIFICATION

The International Bureau transmits herewith the following documents  
and number thereof:

1 (number of) copy(s) of the international preliminary  
examination report and annexes (Article 36(3)(a)).

This notification is sent to the above addressee in its capacity as  
an elected Office.

THE INTERNATIONAL BUREAU OF THE WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

Mailing Address:

WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20  
Switzerland

Authorised Officer:

P. Asseeff